



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo Mecanístico da Reação entre Alfa-Nucleófilos
e um Diéster de Fosfato**

Alex Molina Manfredi

Florianópolis
2009

Alex Molina Manfredi

**Estudo Mecanístico da Reação entre Alfa-Nucleófilos
e um Diéster de Fosfato**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera

Florianópolis
2009

Alex Molina Manfredi

Estudo Mecanístico da Reação entre Alfa-Nucleófilos e um Diéster de Fosfato

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Orientador

Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Dr. Marcelo Alves Moreira

Florianópolis
2009

“O homem só terá aquilo que deseja,
quando desejar para os outros”.

Agradecimentos

- Agradeço à minha família pelo apoio emocional e espiritual, que me deram coragem e sabedoria para seguir os melhores caminhos durante este curso de graduação.
- Ao professor Faruk Nome pela oportunidade e orientação, além da relação de amizade construída ao longo do curso.
- Ao professor Anthony J. Kirby, pela contribuição neste trabalho.
- Ao Dr. Jacks Priebe, pelos ensinamentos concedidos desde o início de meu trabalho, assim como sua amizade e paciência.
- À Elisa Orth e Michelle Medeiros, pela importante ajuda e motivação para minha organização profissional e pessoal.
- À minha namorada Jaqueline Ramos, pelo seu amor, amizade, companheirismo e sinceridade, que desfruta junto comigo de uma das fases mais importantes da minha vida.
- Ao meu grande amigo Ramon Vitto, pela sua inseparável amizade, junto com seu mal humor cômico.
- Aos meus amigos do Lacti 210 e 203, assim como meus amigos do LABINC.
- Ao departamento de química da UFSC e seus professores.
- Aos membros da banca Marcelo Alves Moreira, Maria da Graça Nascimento, Inês Maria Costa Brighente, pela avaliação e correção deste trabalho.
- À todos os meus amigos do curso de Química, assim como de outros cursos que contribuíram direta e indiretamente para o curso de minha vida.
- Ao apoio financeiro concedido pela Capes, CNPq, FAPESC.
- À Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Ésteres de Fosfato.....	13
2.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato.....	14
2.2 Nucleófilos Alfa	15
3 OBJETIVOS	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 Equipamentos.....	18
4.2 Reagentes	18
4.3 Medidas Cinéticas	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Reação entre EDNPP e hidroxilamina	20
5.2 Reação entre EDNPP e hidroxilaminas metiladas, hidrazina e peróxido de hidrogênio	24
5.3 Relação Linear de Energia Livre e Carga Efetiva	25
5.4 Identificação de Produtos: RMN ^1H e ^{31}P	29
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para o ataque nucleofílico sobre um monoéster de fosfato dianiônico. O asterisco corresponde a um estado de transição sincrônico e as coordenadas A_N e D_N correspondem às distâncias N-P e P-OR, respectivamente.	15
Figura 2 – Fórmula estrutural condensada para alguns nucleófilos detentores de efeito alfa.	16
Figura 3 – Espectros sucessivos de UV-Vis da reação entre EDNPP ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e hidroxilamina (0,4 M) a 25 °C, pH = 9,00 e $\mu = 1,0$ M (KCl).	20
Figura 4 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH, para a reação entre EDNPP ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e hidroxilamina (0,4M) a 25 °C, $\mu=1,0$ M (KCl) para $pH \leq 12$ e $\mu=0$ para $pH > 12$	21
Figura 5 – (A) k_{obs} vs $[NH_2OH]$, para a reação com EDNPP ($2,0 \times 10^{-5}$ M) a 25 °C, $\mu=1,0$ M (KCl), pH=9,0 e $[KHCO_3]=0,01$ M. (B) k_{obs} vs $[KOH]$, para a reação com EDNPP ($2,0 \times 10^{-5}$ M) a 25 °C e $\mu= 1,0$ M (KCl).	22
Figura 6 – (A) Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em função da concentração de KCl para a reação entre EDNPP ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e hidroxilamina (0,4M) a 25°C, $[KOH]=0,04$ M(●), 0,2M(▲) e 0,4M(■). (B) Constantes de velocidade observada (k_{obs}), calculada para $\mu=0$, em função da concentração de KOH.	23
Figura 7 – k_{obs} em função da concentração de nucleófilo na reação com EDNPP , a 25°C, $\mu=1,0$ M, $[KHCO_3]=0,01$ M e pH=9,0 (Dados de HOO^- em pH=11,65): (A) MeNHOH(▲), NH_2OH (●), $(Me)_2NOH$ (■) e NH_2OMe (▼); (B) HOO^- (◆) e NH_2NH_2 (Δ).	24
Figura 8 – Gráfico de Brønsted para alfa nucleófilos e nucleófilos comuns nas reações com EDNPP	26
Figura 9 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para a transferência do grupo fosforila entre os grupos P-OR e P-Nü.	28
Figura 10 – Espectros de RMN ¹ H (região aromática) da reação entre EDNPP (0,06M) e (A) H ₂ O, após 20 horas a 25 °C e pH=13,0; e (B) NH_2OH (0,35 M), após 5, 50 e 150 minutos a 35 °C e pH=7,0.	29
Figura 11 – Espectros de RMN ¹ H (região alifática) da reação entre EDNPP (0,06 M) e (A) H ₂ O, após 20 horas a 25 °C e pH=13,0; e (B) NH_2OH (0,35M), após 5, 112 e 150 minutos a 35 °C e pH=7,0.	31

Figura 12 – Espectros de RMN³¹P da reação entre **EDNPP** (0,06M) e **(A)** H₂O, após 20 horas a 25°C e pH=13,0; e **(B)** NH₂OH (0,35M), após 0, 57, 121 e 150 minutos a 35°C e pH=7,0.....32

Figura 13 – Espectros de RMN¹H (região aromática) após 4 horas de reação entre **EDNPP**(0,01M) e **(A)**NH₂OMe (2M), **(B)**Me₂NOH (2M) e **(C)**MeNHOH (2M), em D₂O, 25°C e pH=9,0.....33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) e dissociação utilizadas no ajuste da curva do gráfico da Figura 4	22
Tabela 2 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em $\mu = 0$ e $\mu = 1$, para a reação entre EDNPP ($2,0 \times 10^{-5} M$) e hidroxilamina (0,4M) em diferentes pHs, a 25°C.	23
Tabela 3 – Constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) para as reações $S_N2(P)$ entre EDNPP e diferentes nucleófilos alfa.....	25
Tabela 4 – Dados de RMN para os produtos da reação entre NH_2OH e EDNPP	30
Tabela 5 – Porcentagem de ataque nucleofílico no anel (S_NAr) e no átomo de fósforo ($S_N2(P)$), calculados a partir dos dados de RMN 1H	34

LISTA DE ABREVIATURAS

LaCFI – Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais

EDNPP – etil 2,4-dinitrofenil fosfato

MDNPP – metil 2,4-dinitrofenil fosfato

BDNPP – bis – (2,4-dinitrofenil) fosfato

DNP – 2,4-dinitrofenolato

DEDNPP – dietil 2,4-dinitrofenil fosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

eq – equilíbrio

E.T – Estado de Transição

NUC – Nucleófilo

LG – grupo de saída

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S_N1 – Substituição Nucleofílica Unimolecular

S_N2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular

S_N2(P) – Substituição Nucleofílica Bimolecular sobre o átomo de fósforo

S_NAr – Substituição Nucleofílica Aromática

UV/Vis – Espectro de Ultravioleta e Visível

RESUMO

Além de sua grande importância biológica (RNA e DNA), os ésteres fosfóricos são utilizados industrialmente na fabricação de defensivos agrícolas e armas químicas. Por serem substâncias altamente estáveis, cuja decomposição pode levar milênios, surge a necessidade do uso de substâncias para acelerar esse processo. Uma estratégia moderna para acelerar a hidrólise desses ésteres utiliza nucleófilos detentores do efeito alfa, o qual é definido como o aumento da reatividade de nucleófilos que têm pares de elétrons não compartilhados sobre o átomo adjacente ao centro nucleofílico, quando comparados a um nucleófilo normal de mesma basicidade. As reações entre o **EDNPP** e nucleófilos alfa foram realizadas em solução aquosa a 25°C, $[\text{EDNPP}] = 2,0 \times 10^{-5}$ M, força iônica 1,0M (KCl), 0,01M de tampão, variando a concentração dos nucleófilos alfa. As constantes de velocidade foram obtidas por espectroscopia UV-Vis, e mostraram que o ataque da hidroxilamina para a transferência do grupo fosforila ocorre a uma velocidade $2,0 \times 10^5$ vezes maior do que para o ataque da água. O valor do coeficiente de Brønsted para a reação com diferentes nucleófilos alfa ($\beta_{\text{nuc}} = 0,40$), indica que, no estado de transição, a ligação entre o nucleófilo e o átomo de fósforo está 23% formada, valor consistente com um mecanismo mais dissociativo para essa reação. Além disso, o fato da *O*-metilhidroxilamina apresentar uma reatividade menor em comparação com as outras hidroxilaminas, indica que o ataque dos nucleófilos pode ocorrer preferencialmente pelo átomo de oxigênio. Além disso, os sinais apresentados nos espectros de RMN¹H indicaram a formação de 100, 60, 50, e 40% de produtos decorrentes da reação de substituição nucleofílica bimolecular no átomo de fósforo para Me₂NOH, NH₂OH, NH₂OMe, e MeNHOH, respectivamente, o que corrobora as sugestões mecanísticas apresentadas.

1 INTRODUÇÃO

O controle da formação e estabilidade de ésteres de fosfato é fundamental para a vida. Os ésteres e anidridos fosfóricos são os principais responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA), participam da estrutura de coenzimas e servem como reserva de energia. Além disso, são utilizados como reagentes na preparação de plastificantes, polímeros organofosforados, complexantes, pesticidas e armas de guerra.

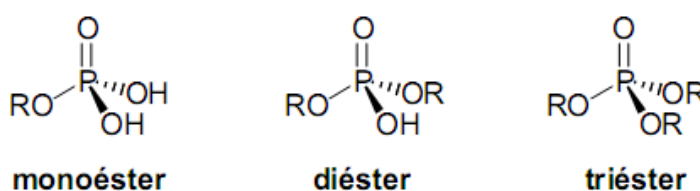
Os fosfodiésteres são compostos muito estáveis, por exemplo, o tempo de meia vida para a hidrólise espontânea do difenilfosfato é de 180 anos a 100 °C. Já a hidrólise espontânea do DNA em solução neutra é tão lenta que a constante de velocidade é desconhecida. Tal estabilidade é coerente com o papel fundamental do DNA na preservação da informação genética e, faz com que o estudo dos mecanismos de clivagem de fosfatos orgânicos seja de extrema importância. Uma estratégia bastante interessante para acelerar a hidrólise desses compostos utiliza nucleófilos detentores do efeito alfa, o qual é definido como o aumento da reatividade de nucleófilos que têm pares de elétrons não compartilhados sobre o átomo adjacente ao centro nucleofílico, quando comparados a um nucleófilo normal de mesma basicidade.

Nesse sentido, este trabalho é fundamentado na transferência do grupo fosforila em diésteres de fosfato, pois se estima que um terço de todas as proteínas celulares são fosforiladas como reflexo da participação dessas reações em diversos processos fisiológicos. Assim, compreender como o mecanismo de catálise enzimática ocorre é essencial para modular esses processos com interesse terapêutico e permitir o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, a compreensão desses sistemas pode nos propiciar o planejamento de estruturas mais simples e igualmente ativas que poderão participar como enzimas ou mesmo suplementando uma dada atividade enzimática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ésteres de Fosfato

Os ésteres de fosfato formam uma classe de compostos bem abrangente, sendo classificados em mono-, di- e triésteres de acordo com o número de grupos alquila ou arila presentes. Devido à presença de grupos hidroxilas, os mono- e diésteres do ácido fosfórico possuem ainda uma funcionalidade adicional de ácido diprótico ou monoprótico, respectivamente.



Os ésteres fosfóricos apresentam uma função vital nos sistemas biológicos, são responsáveis pelo armazenamento e transmissão de informação genética (DNA e RNA),¹ participam na estrutura de coenzimas,² servem como reserva de energia na forma de anidridos fosfóricos^{3,4} e participam em diversos processos de sinalização e regulação da atividade biológica. Além disso, os ésteres de fosfato apresentam muitas aplicações industriais, podendo ser utilizados como reagentes na preparação de polímeros organofosforados, plastificantes, complexantes de metais pesados, inseticidas e compostos tóxicos utilizados em armas de guerra.⁵

A importância biológica dos ésteres de fosfato está intrinsecamente relacionada à alta estabilidade da ligação P-O, que pode levar milhões de anos para ser quebrada. O tempo de meia vida para a hidrólise espontânea de um diéster de fosfato ultrapassa 13 milhões de anos e esse valor pode chegar à ordem de bilhões de anos para o DNA.⁶ Acredita-se que essa grande estabilidade conjurou através da evolução para que moléculas biológicas como o DNA e RNA tenham sido escolhidas para o armazenamento e transporte da informação genética.

Assim, para que as reações de hidrólise com um tempo de meia-vida superior à idade da terra (aproximadamente 4 bilhões de anos) ocorram em poucos segundos, as condições devem ser inteiramente favoráveis. Para realizar esse processo, a presença de substâncias capazes de aumentar a velocidade da reação por fatores

superiores a 10^{17} vezes é imprescindível⁷. Em sistemas biológicos isso é mediado por cinases e fosfatases que realizam cataliticamente a síntese e a quebra de ligações P-O, respectivamente.⁸ Em geral, o mecanismo envolve uma estrutura enzimática complexa, onde a estrutura e o sítio ativo enzimático podem favoravelmente criar um microambiente, ativando e permitindo a aproximação dos substratos.

2.1.1 Reações de substituição nucleofílica em ésteres de fosfato

As transferências do grupo fosforila são reações de substituição nucleofílica que compreendem três mecanismos, e podem ser resumidos em um diagrama de More O'Ferrall-Jencks (**Figura 1**):

- i. Coordenada $R \rightarrow S \rightarrow P$, mecanismo dissociativo, do tipo S_N1 ($D_N + A_N$), é uma possibilidade somente para monoésteres de fosfato e acontece em duas etapas, a primeira é determinante da velocidade de reação e leva à formação de um íon estável metafosfato (PO_3^-), e a segunda é o ataque de um nucleófilo sobre o íon formado na etapa anterior;
- ii. Coordenada $R \rightarrow Q \rightarrow P$, mecanismo associativo, ocorre em duas etapas, adição e eliminação ($A_N + D_N$), passando pela formação de um intermediário fosforano;
- iii. Coordenada $R \rightarrow P$, mecanismo concertado ($A_N D_N$), ocorre sem a formação de um intermediário, com adição e eliminação em uma etapa.

A separação entre esses mecanismos é somente instrucional, sendo que usualmente as reações são concertadas. Em geral, os estados de transição das reações de triésteres e diésteres de fosfato situam-se entre o estado de transição sincrônico $A_N D_N$ e o canto Q, enquanto que os das reações envolvendo monoésteres situam-se no lado oposto.

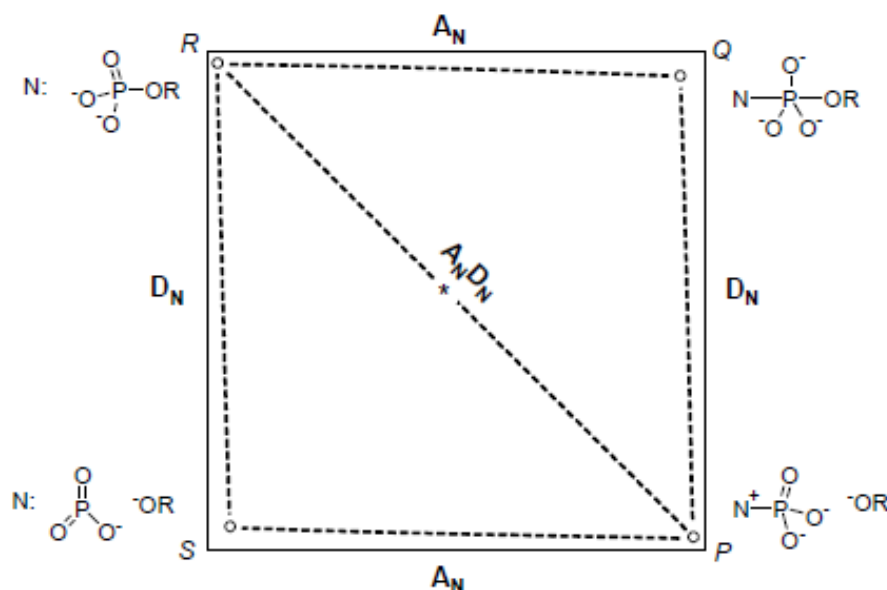


Figura 1 – Diagrama de More O’Ferrall-Jencks para o ataque nucleofílico sobre um monoéster de fosfato dianiônico. O asterisco corresponde a um estado de transição sincrônico e as coordenadas A_N e D_N correspondem às distâncias N-P e P-OR, respectivamente.

Resultados experimentais, como valores de β_{NUC} , β_{LG} e efeitos isotópicos para hidrólise de ânions de diésteres de fosfato evidenciam um estado de transição mais sincrônico que para os monoésteres de fosfato.⁹ Sugere-se que reações de hidrólise de diésteres de fosfato derivados de fenóis com baixos valores de pK_a devem seguir um mecanismo bimolecular associativo com caráter concertado, levando à formação de um estado de transição com natureza semelhante a um fosforano dianiônico, sem formar um intermediário. Analogamente, a hidrólise da espécie neutra do diéster tem sido explicada por um mecanismo envolvendo transferência de próton, com um estado de transição altamente hidratado.¹⁰

2.2 Nucleófilos Alfa

O efeito alfa é a reatividade especial mostrada por um centro nucleofílico que está vizinho a um átomo contendo um par de elétrons livres e que, como consequência, mostra uma reatividade superior daquela esperada para um nucleófilo com o mesmo valor de pK_a .¹¹ A hidroxilamina, o íon hidroperóxido, os

ácidos hidroxâmicos e a hidrazina são alguns exemplos de nucleófilos que apresentam o efeito alfa. (**Figura 2**)

Nucleófilos com efeito α	$\ddot{X}-Y:$
Hidroxilamina	H_2N-OH
Hidroperóxido	$HO-O^{\ominus}$
Ácidos Hidroxâmicos	$\begin{array}{c} O \\ \\ RC-NHOH \end{array}$
Hidrazina	H_2N-NH_2

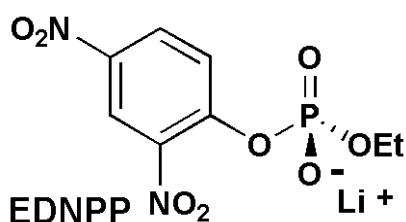
Figura 2 – Fórmula estrutural condensada para alguns nucleófilos detentores de efeito alfa.

Devido à reatividade extraordinária apresentada pelos nucleófilos detentores do efeito alfa, esses tem sido largamente utilizados na clivagem de compostos extremamente estáveis. Por exemplo, a clivagem do diéster bis-(2,4-dinitrofenil) fosfato (**BDNPP**) foi estudada por Domingos e colaboradores¹³, e mostrou que a desfosforilação ocorre com um incremento na velocidade de aproximadamente 10^3 vezes na presença de diferentes alfa nucleófilos, apresentando um $t_{1/2}$ de aproximadamente 1 hora.¹⁴ Entretanto, diversos produtos são formados nessas reações, dependendo do nucleófilo, mas em todos os casos a reatividade é extremamente superior à observada para os nucleófilos não detentores do efeito alfa.

Dentre esses nucleófilos de reatividade inusitada, destacam-se os estudos que envolvem o mecanismo de ataque nucleofílico da hidroxilamina, principalmente porque a seletividade por um de seus centros nucleofílicos (N vs O) é dependente do tipo de substrato. As reações de alquilação ocorrem via átomo de nitrogênio, enquanto que, em reações envolvendo ésteres de acila¹⁶ e fosforila¹⁷ o ataque nucleofílico acontece preferencialmente pelo átomo de oxigênio, mesmo o átomo de nitrogênio sendo consideravelmente mais básico.

3 OBJETIVOS

De acordo com o interesse geral do grupo de pesquisa LaCFI (Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais) em mecanismos de reações orgânicas, principalmente naquelas que envolvem a química dos ésteres de fosfato, o objetivo deste trabalho é estudar a reação do etil 2,4-dinitrofenil fosfato (**EDNPP**) com diferentes nucleófilos alfa.



Dentro de um conjunto de estratégias específicas para atingir o objetivo geral deste trabalho, destacam-se:

- Sintetizar e caracterizar o **EDNPP**;
- Determinar as constantes de velocidade das reações entre **EDNPP** e diferentes nucleófilos (Me_2NOH , MeNHOH , NH_2OH , NH_2OMe , HOOH e NH_2NH_2) utilizando a técnica de espectroscopia UV-Vis;
- Aplicar os conceitos de correlações lineares de energia livre e carga efetiva no estudo de mecanismo, com a finalidade de conhecer a estrutura aproximada do estado de transição;
- Identificar os produtos da reação utilizando Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{31}P .

4 METODOLOGIA

4.1 Equipamentos

As medidas cinéticas foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50, acoplado a um banho termostático da Microquímica, modelo MQBTC99-20, e a um microcomputador, contendo sistema de aquisição e tratamento de dados Cary WinUV 3.00. Em todas as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo com capacidade de 3,5 mL e 1,0 cm de caminho ótico.

As regressões lineares e não-lineares para ajustes de dados cinéticos foram realizadas com o programa de computação ORIGIN versão 7.5.

As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro digital Hanna, calibrado a 25°C com soluções padrões pHs 4,00, 7,00 e 10,00 (Carlo Erba). Para as medidas em D₂O a 25°C, os valores de pD foram corrigidos considerando a **Equação 1**.¹⁵

$$\text{pD} = \text{pH} + 0,4 \quad (1)$$

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ³¹P foram realizadas a 25°C, em D₂O a 400 e 162 MHz, respectivamente, em um espectrômetro Varian Mercury Plus 400-MHz. Foram utilizados 3-(trimetilsil) propionato de sódio (TSP) como referência interna para RMN ¹H e ácido fosfórico 85% como referência externa para RMN³¹P.

4.2 Reagentes

O substrato etil 2,4-dinitrofenil fosfato (**EDNPP**) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Moss e Ihara.¹⁸ A água deuterada (D₂O) foi adquirida da Cambridge Isotope Laboratories, com grau de pureza rotulado em 99,9%. O NaOD (40%) e o DCI (37%) foram adquiridos da Aldrich e utilizados como recebidos. Os demais reagentes foram adquiridos da Aldrich, Carlo Erba, Acros e Vetec, e tratados com técnicas adequadas quando necessário.

4.3 Medidas Cinéticas

As reações foram iniciadas pela adição de uma alíquota de 30 μL da solução estoque $2,0 \times 10^{-3} \text{M}$ de **EDNPP** em acetonitrila (estocada em freezer) a 3 mL da solução tamponada contendo um largo excesso do nucleófilo ($> 0,1 \text{ M}$) em uma cela de quartzo, as quais foram deixadas termostatizar na temperatura desejada. Dessa forma, a concentração do substrato nas reações foi $2,0 \times 10^{-5} \text{M}$, assegurando condições de pseudo-primeira ordem. Os pHs das medidas cinéticas foram mantidos com os seguintes tampões: acetato de potássio (pH 4,00-5,25); ácido bórico/borato (pH 7,75-9,00); bicarbonato de potássio (pH 8,70-10,70) e hidróxido de potássio (pH ≥ 12). As soluções preparadas com as hidroxilaminas são auto-tamponantes entre pHs 4,00 e 7,00, sendo necessário apenas o ajuste prévio de pH. A força iônica foi mantida em 1,0 M em todas as medidas cinéticas pela adição de quantidades adequadas de solução de KCl.

As reações entre **EDNPP** e os diferentes nucleófilos foram acompanhadas pelo aparecimento do 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) em 360 nm. Em todos os casos, foram registrados espectros de UV-Vis durante aproximadamente cinco tempos de meia-vida ($t_{1/2}$). A partir dos gráficos de absorvância em função do tempo, foram determinadas as constantes de velocidade observadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reação entre EDNPP e hidroxilamina

As constantes cinéticas para as reações entre **EDNPP** e hidroxilamina foram obtidas através de espectroscopia de UV-Vis, acompanhando a formação do produto 2,4-dinitrofenolato (**DNP**) em 360 nm (**Esquema 1**). A **Figura 3** representa um conjunto típico de espectros UV-Vis para essas reações. Observou-se um comportamento cinético característico de primeira ordem, conforme ilustrado no gráfico de absorvância em função do tempo inserido na **Figura 3**.

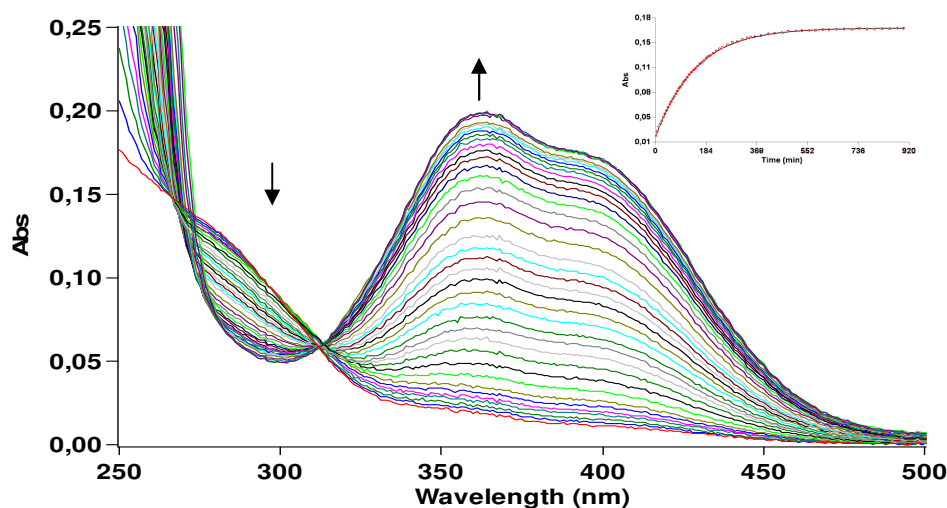
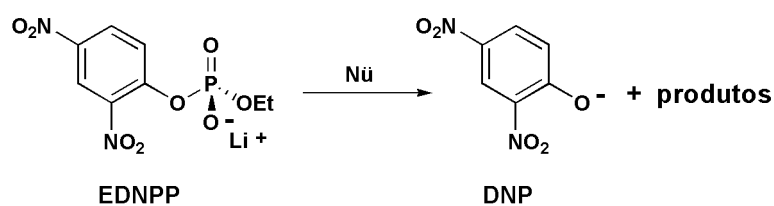
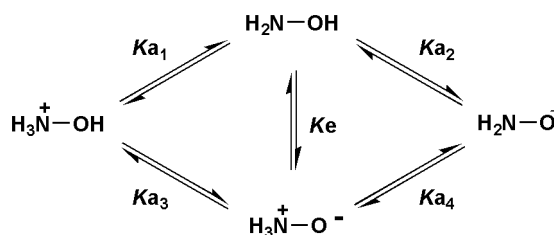


Figura 3 – Espectros sucessivos de UV-Vis da reação entre **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5}$ M) e hidroxilamina (0,4 M) a 25 °C, pH = 9,00 e μ = 1,0 M (KCl).



Conforme ilustrado no **Esquema 2**, a hidroxilamina pode estar presente em diferentes formas, de acordo com as constantes de dissociação. Com isso, o perfil de pH (**Figura 4**) apresenta três regiões distintas: (i) região entre pH 4 e 7, onde a velocidade da reação aumenta conforme o aumento da concentração da espécie

neutra da hidroxilamina (NH_2OH); (ii) região entre pH 7 e 10, onde o patamar representa basicamente a presença das espécies neutra (NH_2OH) e dipolar iônica ($^+\text{NH}_3\text{O}^-$); (iii) região acima de pH 10, onde há um aumento na velocidade da reação devido ao aumento da concentração da espécie aniônica da hidroxilamina (NH_2O^-) e do íon hidróxido (HO^-). O perfil de pH foi ajustado segundo a **Equação 2**, e considerando os equilíbrios do **Esquema 2**, tem-se a **Equação 3**.



Esquema 2

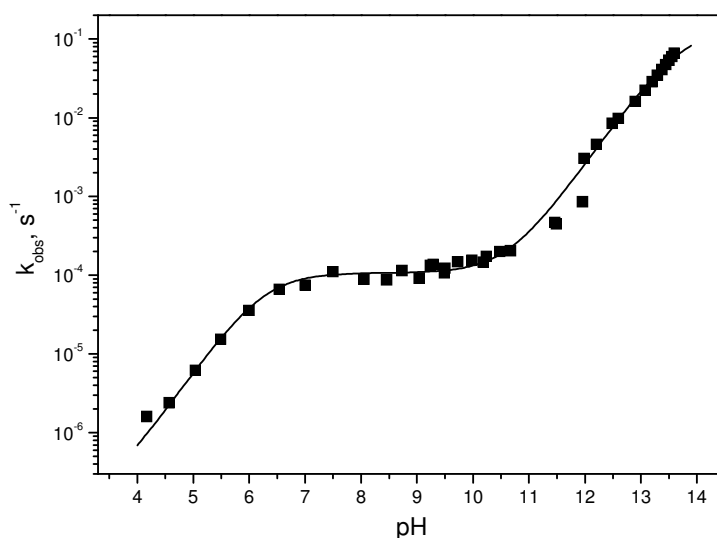


Figura 4 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em função do pH, para a reação entre **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5} \text{M}$) e hidroxilamina (0,4M) a 25 °C, $\mu=1,0 \text{M}$ (KCl) para $\text{pH} \leq 12$ e $\mu=0$ para $\text{pH} > 12$.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] + k_{\text{NH}_2\text{OH}} \chi_{\text{NH}_2\text{OH}} + k_{\text{NH}_2\text{O}^-} \chi_{\text{NH}_2\text{O}^-} \quad (2)$$

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}} [\text{OH}^-] + \frac{k_{\text{NH}_2\text{OH}} [\text{NH}_2\text{OH}]}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[\text{H}^+]}} + \frac{k_{\text{NH}_2\text{O}^-} [\text{NH}_2\text{OH}]}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2}}} \quad (3)$$

O valor da constante de segunda ordem (k_2) foi obtido através do coeficiente angular do gráfico de k_{obs} versus concentração de hidroxilamina (**Figura 5A**), onde a reação é linearmente dependente da concentração de hidroxilamina. Do mesmo modo, com o gráfico da variação de k_{obs} em função da concentração de hidróxido de potássio (**Figura 5B**), pode-se determinar o valor de k_2 para a reação do íon hidróxido com **EDNPP**.

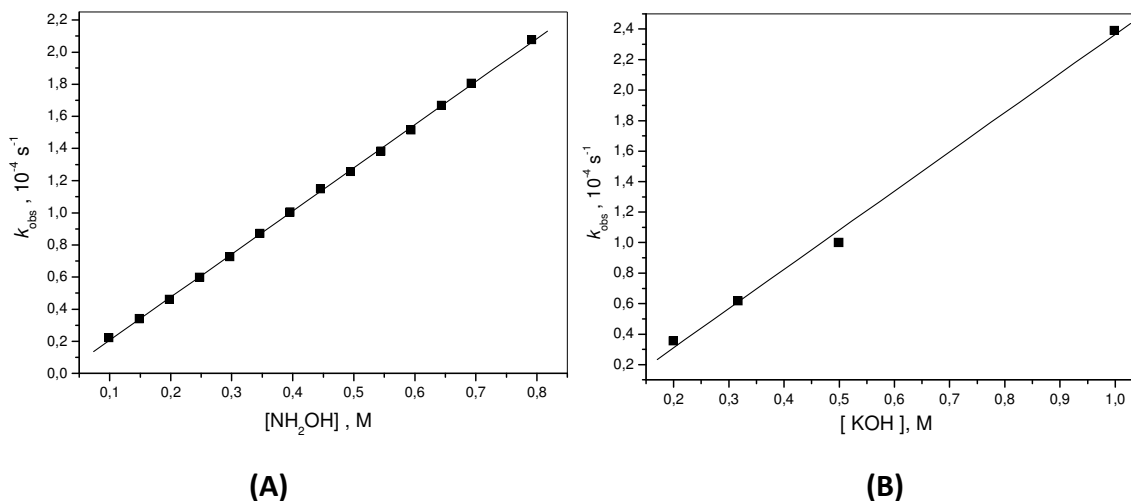


Figura 5 – (A) k_{obs} vs $[\text{NH}_2\text{OH}]$, para a reação com **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) a 25°C , $\mu=1,0 \text{ M}$ (KCl), $\text{pH}=9,0$ e $[\text{KHCO}_3]=0,01 \text{ M}$. (B) k_{obs} vs $[\text{KOH}]$, para a reação com **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) a 25°C e $\mu=1,0 \text{ M}$ (KCl).

Os valores de $\text{p}K_{\text{a}}$ s utilizados na **Equação 2** para o ajuste teórico, foram obtidos da literatura¹⁹ e estão apresentados na **Tabela 1**, juntamente com os valores calculados para as constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) das diferentes espécies reativas. O valor de k_2 utilizado para a hidrólise espontânea (H_2O) é baseado na hidrólise de um diéster similar, o metil 2,4-dinitrofenil fosfato (**MDNPP**)²⁰.

Tabela 1 – Constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) e dissociação utilizadas no ajuste da curva do gráfico da **Figura 4**.

Nucleófilo	$\text{p}K_{\text{a}}^{(19)}$	$k_2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
H_2O	-1,54	$1,30 \times 10^{-9}^{(20)}$
NH_2OH	5,96	$2,68 \pm 0,02 \times 10^{-4}$
NH_2O^-	13,74	$1,89 \pm 0,43 \times 10^{-1}$
OH^-	15,54	$2,57 \pm 0,11 \times 10^{-4}$

Acima de pH=12, a reação entre **EDNPP** e hidroxilamina apresentou sensibilidade aos efeitos da força iônica. Então, com a finalidade de corrigir esses efeitos, foram obtidas as constantes de velocidade observada em função da concentração de KCl (**Figura 6A**) em três diferentes pHs. Posteriormente, as regressões lineares foram extrapoladas para força iônica igual à zero (**Figura 6B**) e a magnitude dos efeitos pode ser observada na **Tabela 2**.

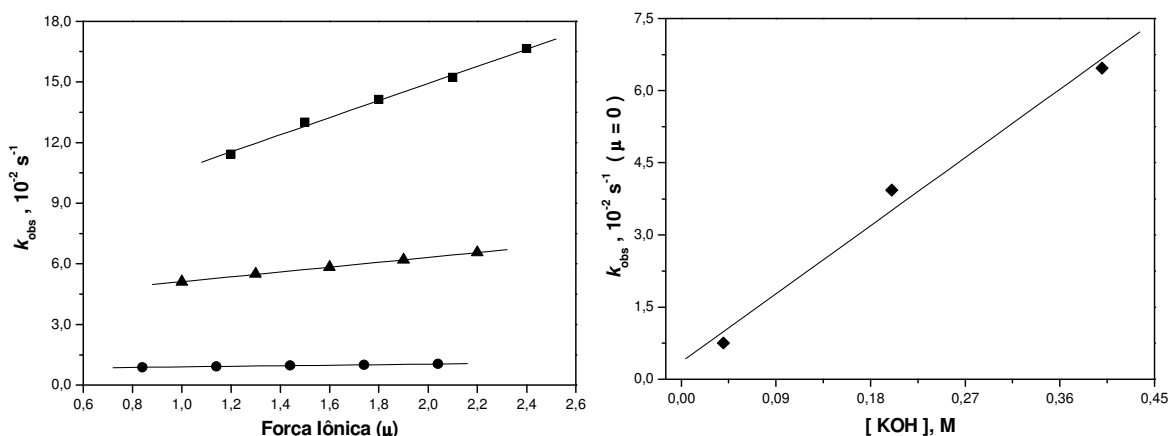


Figura 6 – (A) Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em função da concentração de KCl para a reação entre **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5} \text{M}$) e hidroxilamina ($0,4 \text{M}$) a 25°C , $[\text{KOH}] = 0,04 \text{M}$ (●), $0,2 \text{M}$ (▲) e $0,4 \text{M}$ (■). (B) Constantes de velocidade observada (k_{obs}), calculada para $\mu = 0$, em função da concentração de KOH.

Tabela 2 – Constantes de velocidade observada (k_{obs}) em $\mu = 0$ e $\mu = 1$, para a reação entre **EDNPP** ($2,0 \times 10^{-5} \text{M}$) e hidroxilamina ($0,4 \text{M}$) em diferentes pHs, a 25°C .

pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\mu = 1$)	$k_{\text{obs}}, 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\mu = 0$)	pH	$k_{\text{obs}}, 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\mu = 1$)	$k_{\text{obs}}, 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($\mu = 0$)
12,21	0,51	0,46	13,30	4,53	3,34
12,49	0,86	0,85	13,37	5,80	4,19
12,60	0,94	0,98	13,44	6,90	4,75
12,90	1,45	1,13	13,50	8,08	5,32
13,07	2,36	1,88	13,55	9,30	5,85
13,20	3,49	2,70	13,60	10,60	6,42

5.2 Reação entre EDNPP e hidroxilaminas metiladas, hidrazina e peróxido de hidrogênio

Para a avaliação da reatividade de diferentes nucleófilos (MeNHOH, Me₂NOH, NH₂OMe, NH₂NH₂ e HOOH), foram obtidas as constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) através de um gráfico de k_{obs} vs concentração de nucleófilo. (**Figura 7**)

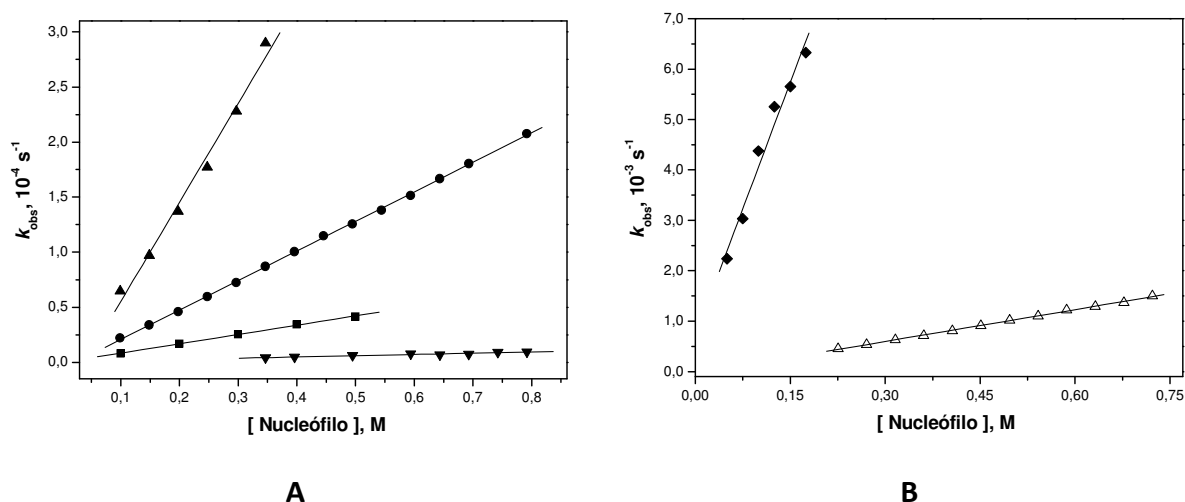


Figura 7 – k_{obs} em função da concentração de nucleófilo na reação com **EDNPP**, a 25°C, $\mu=1,0\text{M}$, $[\text{KHCO}_3]=0,01\text{M}$ e $\text{pH}=9,0$ (Dados de HOO⁻ em $\text{pH}=11,65$): **(A)** MeNHOH(▲), NH₂OH(●), (Me)₂NOH(■) e NH₂OMe(▼); **(B)** HOO⁻(◆) e NH₂NH₂(Δ).

As reações de transferência do grupo fosfato de fosfodiésteres para alguns nucleófilos pode ser muito lenta, favorecendo a competição com reação de substituição nucleofílica aromática. Sendo assim, os dados da **Figura 7A** incluem duas reações: substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) e substituição nucleofílica bimolecular sobre o átomo de fósforo ($\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$). Utilizando os resultados obtidos nos experimentos de RMN¹H, que serão discutidos detalhadamente no item 5.4, as constantes de velocidade de segunda ordem foram corrigidas considerando apenas a reação $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$, os valores estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) para as reações $S_N2(P)$ entre **EDNPP** e diferentes nucleófilos alfa.

Nucleófilo	$pK_a^{(19)}$	$k_2, M^{-1}s^{-1}$	Magnitude do efeito α
H ₂ O	-1,54	$1,30 \times 10^{-9}$	-
NH ₂ OMe ^(a)	4,60	$5,71 \pm 0,12 \times 10^{-6}$	54
Me ₂ NOH	5,20	$8,43 \pm 0,18 \times 10^{-5}$	527
NH ₂ OH ^(a)	5,96	$1,61 \pm 0,02 \times 10^{-4}$	585
MeNHOH ^(a)	6,18	$3,28 \pm 0,38 \times 10^{-4}$	1019
NH ₂ NH ₂ ^(b)	7,98	$1,13 \pm 0,02 \times 10^{-3}$	971
HOO ^{-(c)}	11,65	$6,67 \pm 0,28 \times 10^{-2}$	4172
NH ₂ O ⁻	13,74	$1,89 \pm 0,43 \times 10^{-1}$	2658
OH ⁻	15,54	$2,57 \pm 0,11 \times 10^{-4}$	-

^(a) Valores corrigidos para reação $S_N2(P)$ em 60%, 50%, e 40% para NH₂OH, NH₂OMe e MeNHOH, respectivamente. ^(b) Valor corrigido considerando a probabilidade de 50% ataque por apenas um grupo NH₂ e $\chi_{NH_2NH_2}=0,9128$ ^(c) Valor corrigido considerando $\chi_{HOO^-}=0,5$.

5.3 Relação Linear de Energia Livre e Carga Efetiva

As constantes de velocidade de segunda ordem (k_2) para a reação do **EDNPP** com os diferentes nucleófilos (**Tabela 3**) estão apresentadas na **Figura 8**, na forma de um gráfico de Brönsted. Nesse gráfico, o coeficiente angular é chamado de coeficiente de Brönsted (β). Observou-se uma boa correlação entre basicidade e reatividade dos nucleófilos, e valor de β_{nuc} obtido para a reação entre o **EDNPP** e alfa nucleófilos foi de $0,405 \pm 0,021$. Esse valor é semelhante ao encontrado para a reação com o diéster **BDNPP**.¹⁴ No caso do triéster análogo **DEDNPP**²¹ e diânions de monoésteres^{22,23}, os valores obtidos de β_{nuc} foram 1,13 e 0,16, respectivamente. Esses valores seguem um comportamento típico, onde os valores de β_{nuc} aumentam no sentido mono-<di-< triéster. Além disso, o β_{nuc} para o **EDNPP**, significativamente menor que aquele observado para o triéster **DEDNPP**, reflete em um estado de transição bem mais dissociativo para o **EDNPP**.

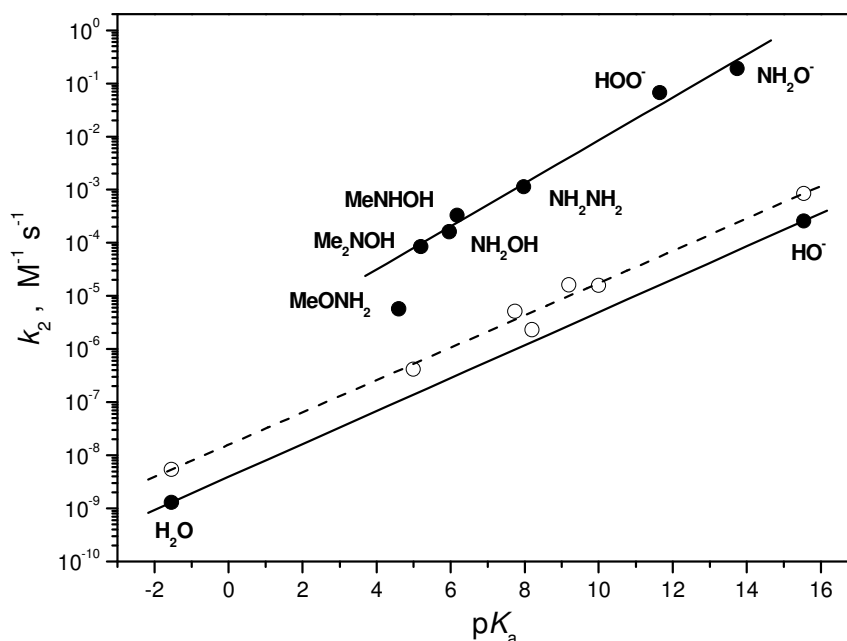


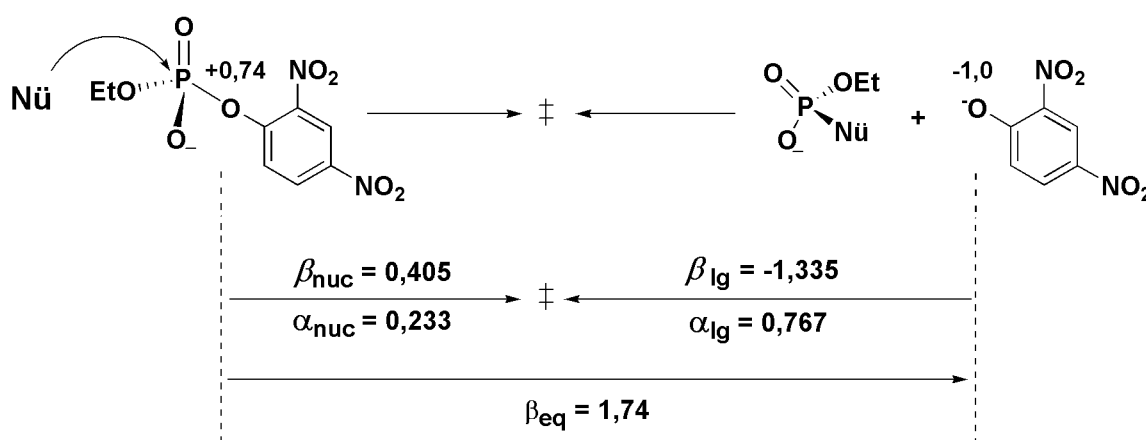
Figura 8 – Gráfico de Brønsted para alfa nucleófilos e nucleófilos comuns nas reações com **EDNPP**. Os pontos fechados correspondem aos dados a 25 °C e os pontos abertos, à reação com o íon hidróxido e outros ânions oxigenados na reação com 2,4-dinitrofenil metil fosfato a 39 °C.²⁰

Na **Figura 8**, pode-se observar que entre as hidroxilaminas estudadas (MeNHOH, Me₂NOH, NH₂OMe e NH₂OH), a espécie monoaniônica apresentou a maior reatividade na reação com **EDNPP**. Além disso, a *O*-metilhidroxilamina possui uma constante de velocidade muito menor em comparação com as outras hidroxilaminas, indicando que o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo deve ocorrer preferencialmente pelo átomo de oxigênio na reação com o **EDNPP**.

O valor de β_{nuc} indica a participação efetiva do nucleófilo para alcançar o estado de transição em uma determinada reação. Em termos de carga efetiva, β_{nuc} indica a carga do estado reagente transferida para chegar ao estado de transição de uma reação nucleofílica. Assim, mapas de carga efetiva podem ser construídos para melhor compreender o mecanismo da reação. Os cálculos são realizados considerando a **Equação 4**²⁴, onde, ϵ_p e ϵ_r correspondem, respectivamente, à carga de um átomo do produto e do reagente envolvidos na reação em estudo e, ϵ_{ps} e ϵ_{rs} , são as cargas para produto e reagente do equilíbrio padrão.

$$\beta_{eq} = \frac{(\epsilon_p - \epsilon_r)}{(\epsilon_{ps} - \epsilon_{rs})} \quad (4)$$

A carga efetiva sobre o átomo de oxigênio do grupo de saída de diésteres de fosfato é tabelada em $(+0,74)^{24}$. A carga efetiva do reagente padrão (fenol) e produto padrão (fenolato) são zero e -1, respectivamente. Aplicando esses valores na **Equação 4**, tem-se o valor de $\beta_{eq}=+1,74$, que indica uma variação de carga sobre o átomo de oxigênio, entre reagente e produtos, igual a 1,74 unidades. (**Esquema 3**)



Esquema 3

Com os valores $\beta_{nuc}=0,405$ e $\beta_{eq}=+1,74$, é possível calcular o valor do β_{lg} que é igual a 1,335. Os valores de β_{nuc} , β_{lg} e β_{eq} permitem a construção do diagrama de More O'Ferral-Jencks. Sendo $\alpha_{nuc}=\beta_{nuc}/\beta_{eq}$ e $\alpha_{nuc}+\alpha_{lg}=1$, então para a reação estudada tem-se $\alpha_{nuc}=0,233$ e $\alpha_{lg}=0,767$, que representam os valores das coordenadas de formação e quebra de ligação, respectivamente. (**Figura 9**)

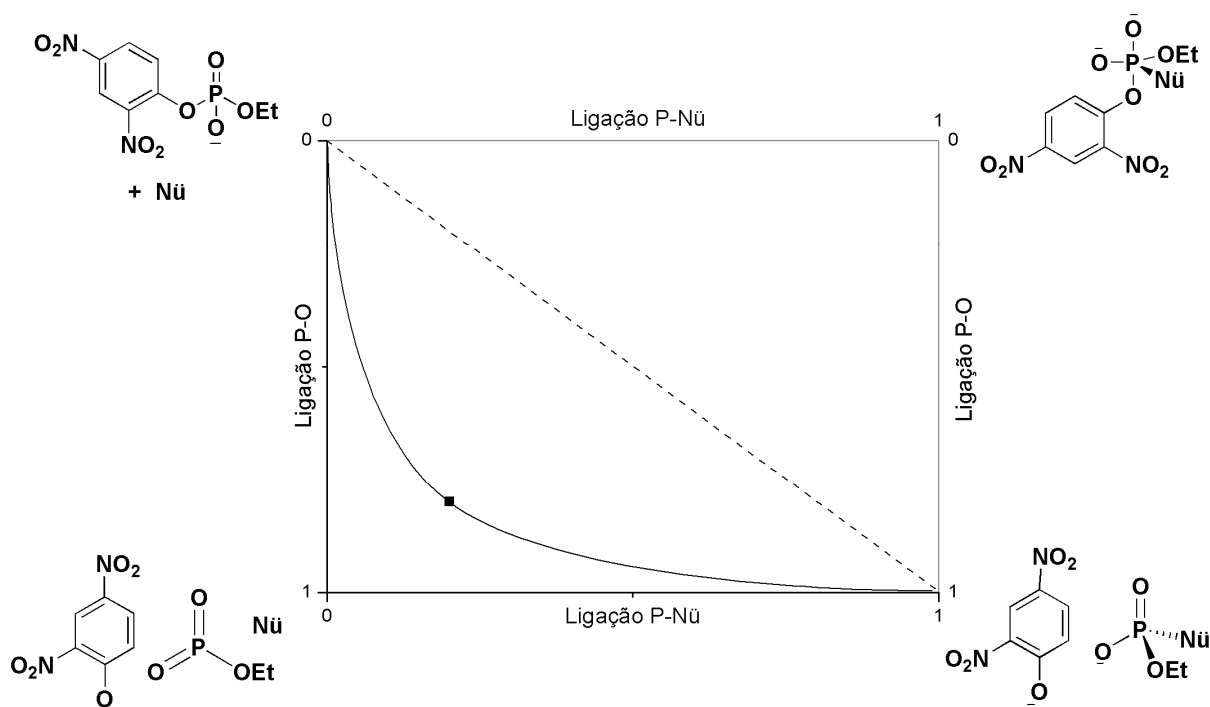
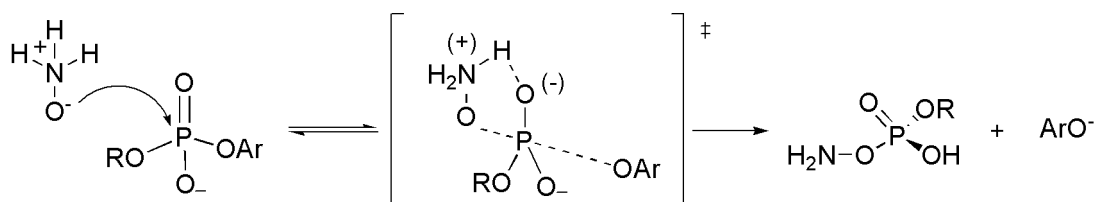


Figura 9 – Diagrama de More O’Ferral-Jencks para a transferência do grupo fosforila entre os grupos P-OR e P-Nü.

O diagrama de More O’Ferral-Jencks mostra que a ligação entre o nucleófilo e o grupo fosfato está 23% formada no ET, sugerindo um caminho reacional com caráter dissociativo e considerável quebra da ligação entre o oxigênio do **DNP** e o átomo de fósforo. No estado de transição deve ainda ocorrer transferência de próton da espécie dipolar iônica da hidroxilamina ao átomo de oxigênio do grupo fosfato (**Esquema 4**), em um mecanismo que parece ter uma forma ideal para o ataque nucleofílico em reações de transferência de grupo fosforila.^{25,26}



Esquema 4

5.4 Identificação de Produtos: RMN ^1H e ^{31}P

Os produtos da reação entre **EDNPP** e hidroxilamina foram monitorados por espectroscopia de RMN ^1H e ^{31}P . Inicialmente, a hidrólise do **EDNPP** foi acompanhada a 25°C e pH=13,0. Nessas condições, o espectro de RMN ^1H obtido após 20 horas de reação (**Figura 9A**) apresentou 6 sinais de hidrogênios na região aromática. Destes, 3 correspondem aos hidrogênios do reagente **EDNPP** (δ =7,74; 8,55; e 8,90 ppm), e 3 sinais mais desblindados (δ =6,74; 8,10; e 8,88 ppm), aos hidrogênios do 2,4-dinitrofenol (**4**), conforme ilustrado no **Esquema 5**.

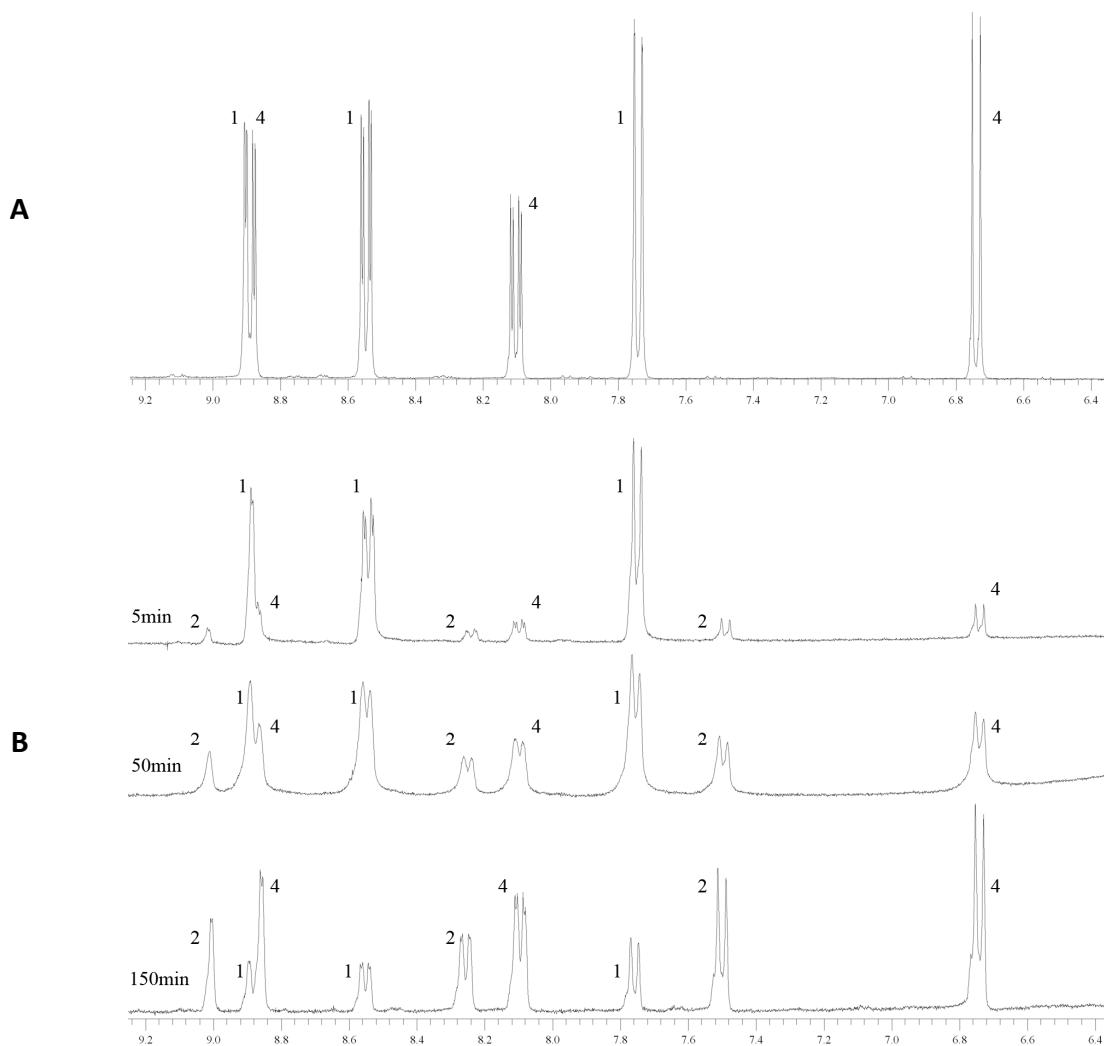
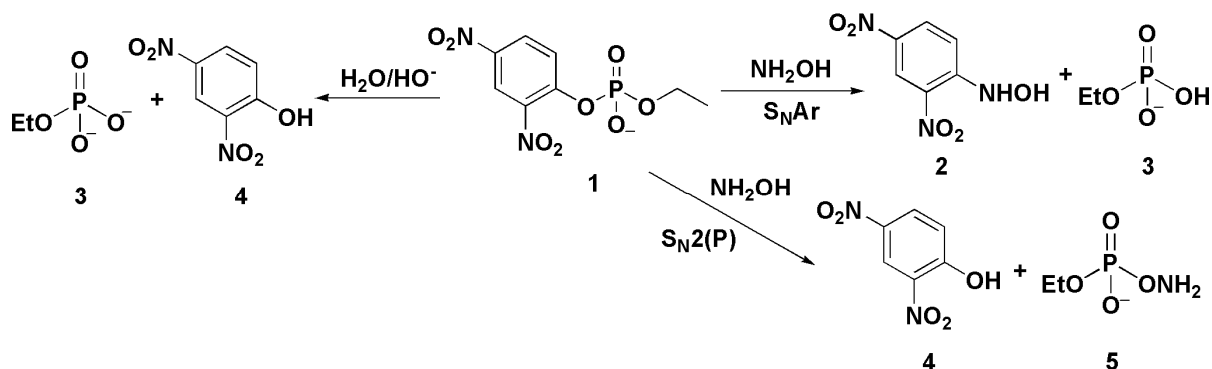


Figura 10 – Espectros de RMN ^1H (região aromática) da reação entre **EDNPP**(0,06M) e **(A)** H_2O , após 20 horas a 25 °C e pH=13,0; e **(B)** NH_2OH (0,35 M), após 5, 50 e 150 minutos a 35°C e pH=7,0. Os deslocamentos químicos e suas respectivas atribuições estão na **Tabela 4**, numerados de acordo com o **Esquema 5**.



Esquema 5

Tabela 4 – Dados de RMN para os produtos da reação entre NH_2OH e **EDNPP**.

Comp.	RMN ^1H δ (ppm)	RMN ^{31}P δ (ppm)
1	δ 4.10 (Quinteto 2H, $J = 7.15$ Hz), 7.75 (d, 1H, $J_{\text{ab}} = 9.20$ Hz, Ar), 8.55 (dd, 1H, $J_{\text{ba}} = 9.20$ Hz e $J_{\text{bx}} = 3.06$ Hz, Ar), 8.89 (d, 1H, $J_{\text{xb}} = 3.06$ Hz, Ar)	-4.16
2	δ 7.50 (d, 1H, $J_{\text{ab}} = 9.54$ Hz, Ar), 8.26 (dd, 1H, $J_{\text{ba}} = 9.54$ Hz e $J_{\text{bx}} = 2.38$ Hz, Ar), 9.00 (d, 1H, $J_{\text{xb}} = 2.38$ Hz, Ar)	
3	δ 3.38 (Quinteto 2H, $J = 7.15$ Hz)	5.47
4	δ 6.74 (d, 1H, $J_{\text{ab}} = 9.54$ Hz, Ar), 8.09 (dd, 1H, $J_{\text{ba}} = 9.54$ Hz e $J_{\text{bx}} = 3.06$ Hz, Ar), 8.85 (d, 1H, $J_{\text{xb}} = 3.06$ Hz, Ar)	
5	δ 3.98 (Quinteto 2H, $J = 7.15$ Hz)	3.68

A **Figura 9B** mostra o aparecimento e o desaparecimento de sinais de hidrogênios aromáticos da mistura reacional entre **EDNPP** e NH_2OH a 35 °C e $\text{pH}=7,0$, obtidos em 5, 50 e 150 minutos de reação. Observa-se que após 5 minutos de reação os sinais do substrato ($\delta=7,75$; 8,55; e 8,89 ppm) ainda estão evidentes, no entanto, em 50 e 150 minutos, diminuem de intensidade, enquanto outros 6 sinais surgem. Desses sinais, 3 hidrogênios apresentam os mesmos deslocamentos químicos do produto da reação $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$ em água ($\delta=6,74$; 8,09; e 8,85 ppm), indicando a formação do 2,4-dinitrofenolato (**4**) na reação com hidroxilamina. Os outros três sinais apresentam um maior deslocamento químico ($\delta=7,50$; 8,26; e 9,00 ppm) que 2,4-dinitrofenolato, sugerindo a presença de um grupo retirador de

elétrons ligado ao anel. Essa observação, sugere a existência do produto *N* ou *O*- (2,4-dinitrofenil) hidroxilamina (**2**) proveniente da reação S_NAr . (**Esquema 5**)

Os sinais observados relativos ao CH_2 do grupo etóxido ligado ao átomo de fósforo estão na **Figura 11**. Os sinais apresentam-se na forma de quinteto, podendo ser considerados como duplo quarteto, pelo acoplamento a distância entre os hidrogênios α e o átomo de fósforo, com $J_{P-H} \approx J_{H-H}$. A **Figura 11A**, mostra o espectro de RMN¹H após 20 horas de reação de hidrólise do **EDNPP** a 25°C e pH=13,0. O sinal em 4,10 ppm corresponde aos hidrogênios do reagente de partida, e 3,81 ppm, ao diânion fosfato de etila (**3**), produto do ataque do íon hidróxido sobre o átomo de fósforo. (**Esquema 5**)

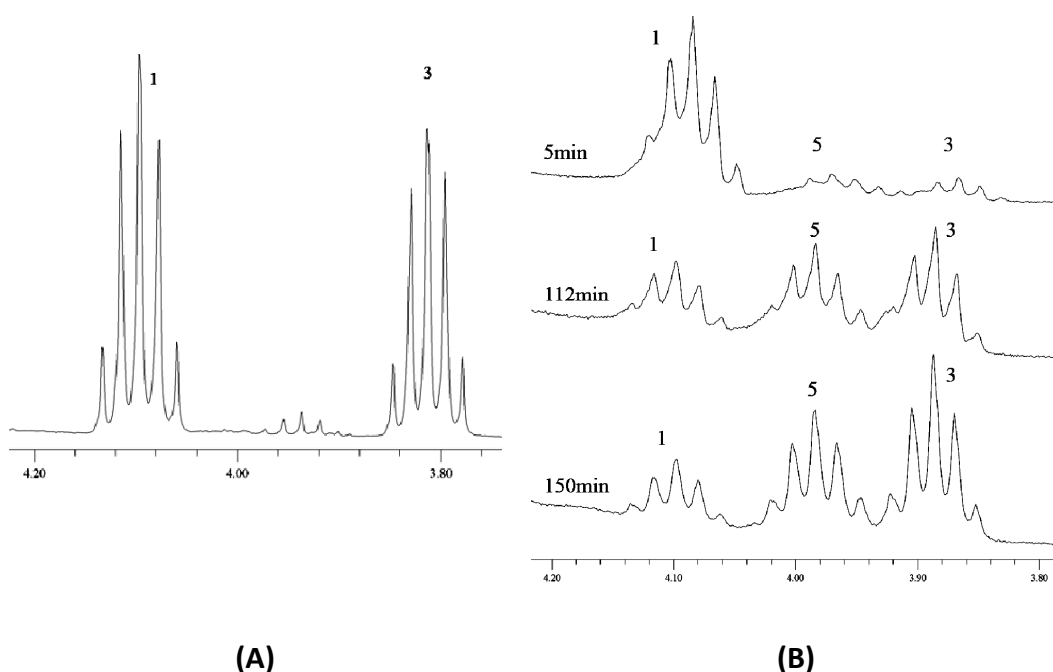


Figura 11 – Espectros de RMN ¹H (região alifática) da reação entre **EDNPP** (0,06 M) e (A) H₂O, após 20 horas a 25°C e pH=13,0; e (B) NH₂OH (0,35M), após 5, 112 e 150 minutos a 35°C e pH=7,0.

Na **Figura 11B**, estão os espectros em 5, 112 e 150 minutos de reação entre **EDNPP** e hidroxilamina, a 35 °C e pH = 7,0. Nessas condições, há dois sinais já descritos para a hidrólise em água (4,10 e 3,88 ppm), sendo que o sinal em 3,88 ppm, neste caso, corresponde ao fosfato de etila diânion (**3**), o qual é produto do ataque da hidroxilamina no anel aromático, visto que o produto da hidrólise pode ser desconsiderado, pois o íon hidróxido está em baixa concentração neste pH. Um

terceiro sinal é observado em 3,98 ppm, que corresponde ao produto do ataque da hidroxilamina sobre o átomo de fósforo (**5**), via reação $S_N2(P)$. (**Esquema 5**)

As reações também foram acompanhadas por RMN³¹P. Observou-se, após 20 horas de hidrólise em pH=13,0 (**Figura 12A**), um gradual desaparecimento do sinal do reagente (**1**) em -4,16 ppm e o aparecimento de um novo sinal em 5,04 ppm, atribuído ao fosfato de etila diânion (**3**). Na presença de hidroxilamina, a 35°C e pH=7,0 (**Figura 12B**), foi observado o desaparecimento do sinal do reagente em -4,16 ppm e o aparecimento dos sinais em 5,47 ppm e 3,68 ppm, referentes ao fosfato de etila diânion (**3**) e ao produto da reação $S_N2(P)$ (**5**), respectivamente.

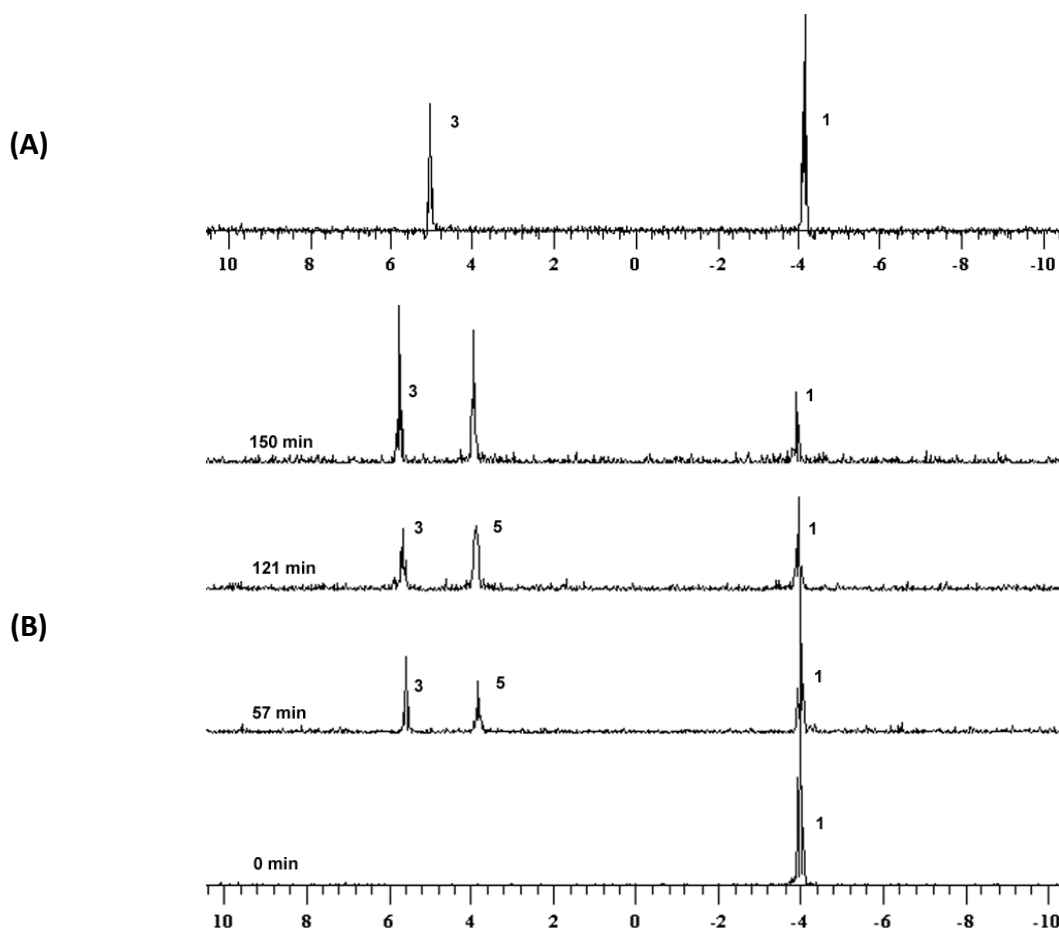


Figura 12 – Espectros de RMN³¹P da reação entre **EDNPP** (0,06M) e **(A)** H₂O, após 20 horas a 25°C e pH=13,0; e **(B)** NH₂OH (0,35M), após 0, 57, 121 e 150 minutos a 35°C e pH=7,0. Os dados de deslocamento químico foram corrigidos considerando o deslocamento do ácido fosfórico 85% como referência externa.

A formação dos produtos das reações entre **EDNPP** e os diferentes derivados metilados da hidroxilamina (MeNHOH , Me_2NOH , e NH_2OMe) também foram acompanhadas por RMN^1H , **Figura 13**.

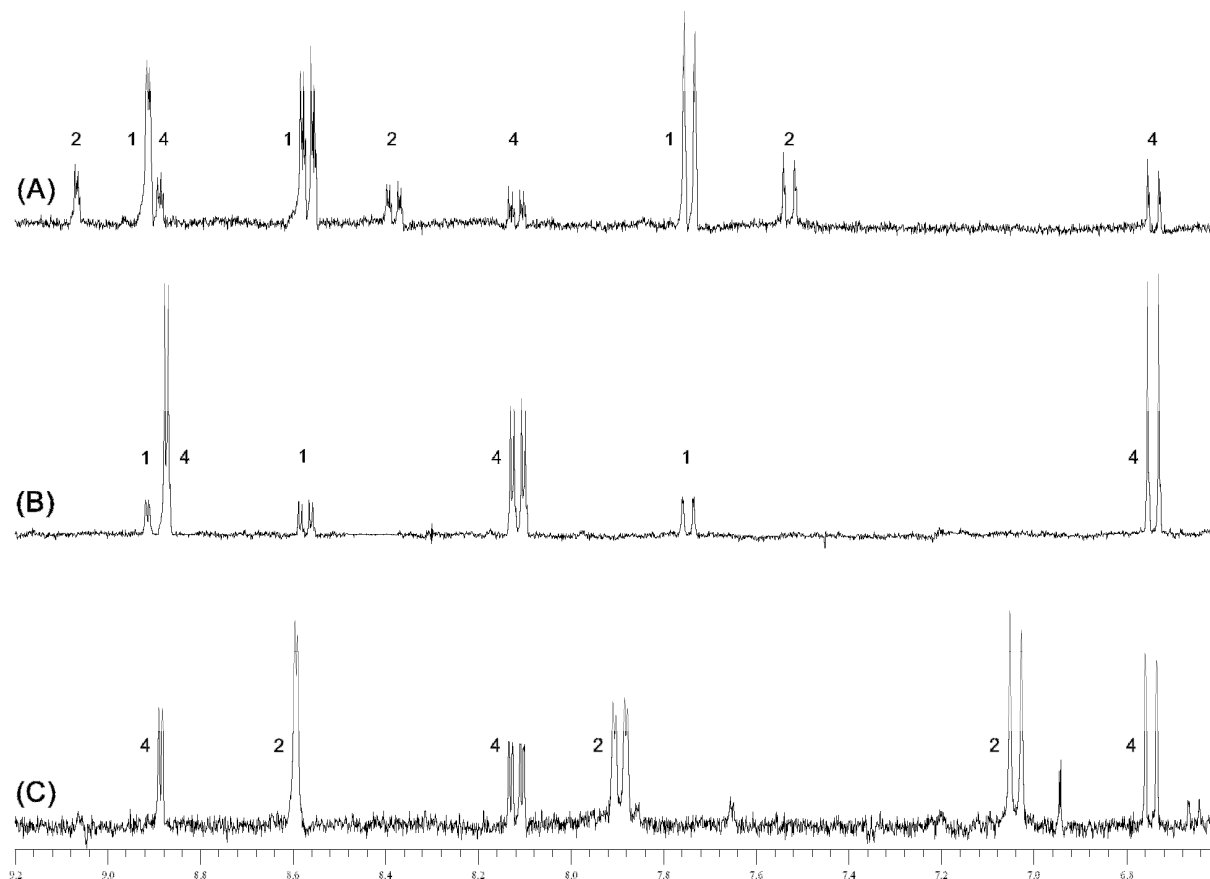


Figura 13 – Espectros de RMN^1H (região aromática) após 4 horas de reação entre **EDNPP** (0,01M) e **(A)** NH_2OMe (2M), **(B)** Me_2NOH (2M) e **(C)** MeNHOH (2M), em D_2O , 25°C e $\text{pH}=9,0$.

A **Figura 13** mostra que o perfil dos espectros das reações com os derivados metilados da hidroxilamina são idênticos aos observados para a reação com hidroxilamina, apresentando apenas uma pequena variação nos deslocamentos químicos dos sinais, devido a presença de metilas nas espécies formadas.

A partir da área relativa aos sinais das **Figuras 10 e 13**, determinou-se as porcentagens do ataque nucleofílico da hidroxilamina e seus derivados metilados sobre o anel aromático ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) e sobre o átomo de fósforo ($\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$). (**Tabela 5**)

Tabela 5 – Porcentagem de ataque nucleofílico no anel (S_NAr) e no átomo de fósforo ($S_N2(P)$), calculados a partir dos dados de RMN 1H .

Nucleófilo	Reação S_NAr	Reação $S_N2(P)$
Hidroxilamina	40 %	60 %
<i>N</i> -metilhidroxilamina	60 %	40 %
<i>N,N</i> -Dimetilhidroxilamina	0 %	100 %
<i>O</i> -metilhidroxilamina	50 %	50 %

Os resultados sugerem que a reação via S_NAr ocorre preferencialmente pelo ataque do átomo de nitrogênio, pois quando este encontra-se impedido, a reação acontece 100% sobre o átomo de fósforo. Entretanto, a reação $S_N2(P)$ se dá sempre que possível pelo átomo de oxigênio, conforme indica a diminuição da porcentagem do ataque sobre o átomo de fósforo de 100% (Me_2NOH) para 50% quando a hidroxilamina é metilada no oxigênio. Portanto, a diferença na porcentagem do ataque nucleofílico no átomo de fósforo e carbono, pode estar associada ao impedimento estérico dos grupos metila ou ainda, à diferença de basicidade das aminas, que segue a ordem $MeNHOH > NH_2OH > Me_2NOH$.

6 CONCLUSÕES

A constante de velocidade na reação de transferência do grupo fosforila para hidroxilamina é 2×10^5 vezes maior que para a água. A espécie aniônica da hidroxilamina é aproximadamente 700 vezes mais nucleofílica que a espécie neutra, demonstrando uma grande diferença de reatividade entre nucleófilos que apresentam ou não o efeito alfa. Além disso, a menor reatividade do derivado *O*-metilado da hidroxilamina, em relação aos demais nucleófilos alfa, sugere que o ataque nucleofílico deve ocorrer preferencialmente pelo átomo de oxigênio.

As relações lineares de energia livre mostram que a reação segue um mecanismo concertado com caráter dissociativo e, no estado de transição a ligação entre o átomo de fósforo e o oxigênio do grupo de saída está 77% rompida e 23% formada em relação aos nucleófilos.

Por fim, os resultados de RMN mostram a formação de produtos provenientes do ataque nucleofílico sobre o átomo de fósforo ($S_N2(P)$) e sobre o carbono do anel aromático (S_NAr). O ataque nucleofílico via mecanismo $S_N2(P)$ provavelmente ocorre pelo átomo de oxigênio, sendo esta, a rota exclusiva no caso da *N,N*-dimetil-hidroxilamina que possui o nitrogênio mais impedido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAENGER, W.; Principles of Nucleic Acid Structure, Springer: New York, p.356. **1984.**
2. DUGAS, H. **Bioorganic Chemistry**: A Chemical Approach to Enzyme Action. 3ed.VCH: New York, p.724. **1996.**
3. WESTHEIMER, F. H. Why nature choose phosphates. **Science**, v.235, p.1173. **1987.**
4. MACHADO, V.G.; NOME, F. Energy-rich phosphate compounds. **Química Nova**, v.22, p.351. **1999.**
5. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A Química dos Ésteres de Fosfato. **Química Nova**, v.26, p.745. **2003.**
6. LIU, C.; WANG, M.; ZHANG, T.; SUN, H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordinated Chemistry Reviews**, v.248, p.147. **2004.**
7. WILLIAMS, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. **Accounts of Chemical Research**, v.32, p.485, **1999.**
8. FERSHT, A. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. Nova Iorque: W.H. Freeman and Company, p.259. **1999.**
9. CLELAND, W. W.; HENGGE, A. C. Enzymatic Mechanisms of Phosphate and Sulfate Transfer. **Chemical Review**, v.106, p.325. **2006.**
10. BUNTON, C. A. Hydrolysis of Orthophosphate Esters. **Accounts of Chemical Research**, v.3, p.257. **1970.**
11. EDWARDS, J. O.; PEARSON, R. G., The Factors Determining Nucleophilic Activities. **J. Am. Chem. Soc.**, v.84, p.16. **1962.**
12. KIRBY, A. J.; MANFREDI, A. M.; SOUZA, B. S.; MEDEIROS, M.; PRIEBE, J. P.; BRANDÃO, T. A. S.; NOME, F., Reactions of alpha nucleophiles with a model phosphate diester. **ARKIVOC**, v.28. **2008.**
13. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BRANDÃO, T. A. S.; BUNTON, C. A.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; NOME, F., Mechanisms of Nucleophilic Substitution Reactions of Methylated Hydroxylamines with Bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. Mass Spectrometric Identification of Key Intermediates. **J. Org. Chem**, V.69, p.6024. **2004.**
14. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F., Reactions of Bis(2,4-dinitrophenyl Phosphate) with Hydroxylamine. **J. Org. Chem**. V.68, p.7051. **2003.**

15. ROIGK, A.; HETTICH, R.; SCHNEIDER, H. J. Unusual catalyst concentration effects in the hydrolysis of phenyl phosphate esters and of DNA: A systematic investigation of the lanthanide series. **Inorganic Chemistry**, v.37, p.751, **1998**.
16. JENCKS, W. P., Hydroxylamine with Activated Acyl Groups. I Formation of O-Acylhydroxylamine. **J. Am. Chem. Soc.**, V.80, p.4581, **1958**.
17. DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; BUNTON, C. A.; NOME, F., Reactions of Bis(2,4-dinitrophenyl) Phosphate with Hydroxylamine. **J. Org. Chem**, v.68, **2003**.
18. MOSS, R. A.; IHARA, Y., Cleavage of Phosphate Esters by Hydroxyl-Functionalized micellar and Vesicular Reagents. **J. Org. Chem**, V.48, p.588, **1983**.
19. MARTELL, A. E.; SMITH, Z. M.; MOTEKAITIS, R. J. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes: NIST Standard Reference Database 46. Gaithersburg: NIST, v.6, **1993**.
20. KIRBY, A. J.; YOUNAS, M. Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Diesters with Nucleophiles. **Journal of the Chemical Society [Section] B: Physical Organic**. v. 6. p. 1165-1172. **1970**.
21. MEDEIROS, M. Estudo Mecanístico da Reação entre Hidroxilamina e um Triéster de Fosfato: Caracterização de Produtos e Intermediários. Florianópolis. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. P.78, **2009**.
22. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. The Reactivity of Phosphate Esters. Monoester Hydrolysis. **J. Am. Chem. Soc.** v. 89. p. 415-423. **1967**.
23. KIRBY, A. J.; VARVOGLIS, A. G. Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Monoesters with Nucleophiles. Nucleophilicity Independent of Basicity in a Biomolecular Substitution Reaction. . **Journal of the Chemical Society [Section] B: Physical Organic**. v. 2. p. 135-141. **1968**.
24. WILLIAMS, A. Free Energy Relationships in Organic and Bioorganic Chemistry. Cambridge: RSC, p.297, **2003**.
25. KIRBY, A. J.; TONDO, D. W. Efficient Intramolecular General Acid Catalysis of the Reactions of α -Effect Nucleophiles and Ammonia Oxide with a Phosphate Triester. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 2023-2028. **2009**
26. KIRBY, A. J.; DAVIES, J. E. Hydroxylamine as an Oxygen Nucleophile. Structure and Reactivity of Ammonia Oxide. **J. Am. Chem. Soc (Communication)**.,v.128, p. 12374-12375, **2006**.